植 物 分 类 与 资 源 学 报 2014, 36 (5): 622~628
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201413225

鸭梨 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆及农杆菌介导的反义遗传转化*

齐 靖[1], 董 祯[2], 张玉星[3]
(1 河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061; 2 河北女子职业技术学院, 河北 石家庄 050091; 3 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要: 研究根据 ACC 氧化酶基因的保守序列设计一对特异性引物, 以鸭梨果实为试材, 借助 RT-PCR 方法扩增得到一条长度为 831 bp 的鸭梨 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段, 该片段编码 276 个氨基酸残基, 与其它梨品种 ACC 氧化酶基因序列同源性均在 94% 以上。将此片段反向插入真核表达载体 pBI121 的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 构建了鸭梨 ACC 氧化酶基因的反义表达载体, 并在农杆菌 LBA4404 的介导下实现对鸭梨组培苗的遗传转化。经 PCR 鉴定证实共有 4 株鸭梨组培苗中外源基因得到成功转化, Southern 杂交显示在这 4 株转基因鸭梨中除有 1 株外源基因呈双拷贝外, 其余 3 株中外源基因均以单拷贝形式存在。
关键词: 梨; ACC 氧化酶; RT-PCR; 反义表达载体; 遗传转化
中图分类号: Q 784 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2014)05-622-07

Cloning of ACC Oxidase Gene from Yali Pear and Tranformation of Its Antisense Expression Vector with Agrobacterium-mediated Method

QI Jing[1], DONG Zhen[2], ZHANG Yu-Xing[3]
(1 *College of Biology Science and Engineering*, *Hebei University of Economics and Business*, Shijiazhuang 050061, China; 2 *Hebei Women's Vocational College*, Shijiazhuang 050091, China; 3 *College of Horticulture*, *Agriculture University of Hebei*, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study, a partial ACC oxidase (ACO) gene-like cDNA sequence was obtained through homology-based cloning from Yali (*Pyrus bretschneideri* cv. 'Yali') plant. Primers were designed according to the highly conserved regions of published ACO gene sequences, and RT-PCR cloning was conducted by using Yali fruit cDNA. The obtained ACO-like cDNA fragment contains 831 base pairs which encodes 276 predicted amino acid residues, and shares no less than 94% nucleotide sequence identity with all published ACO genes. We further inversely inserted the ACO-like cDNA fragment into pBI121 expression vector, and transformed it into tissue cultured Yali plants by using Agrobacterium LBA4404. Finally, 4 independent transgenic lines harboring the anti-sense ACO-like fragment were obtained and validated by PCR analysis. Southern blotting assay revealed 3 transgenic lines containing single copy of the foreign gene, and 1 line with 2 insertion copies.
Key words: Yali pear; ACC oxidase; RT-PCR; Antisense expression vector; Genetic transformation

鸭梨 (*Pyrus bretschneideri* cv. 'Yali') 原产我国, 是我国北方地区主栽的梨品种之一, 也是我国出口创汇的重要果品。鸭梨果实口感甜脆多汁, 不但营养丰富, 还具有生津润燥、镇咳止喘

* 基金项目: 河北省科技计划资助项目 (11220103D-9); 河北省高等学校科学技术研究指导项目 (Z2012065)
收稿日期: 2013-11-20, 2014-02-20 接受发表
作者简介: 齐 靖 (1981-) 男, 博士, 讲师, 主要从事植物生理与分子生物学方面研究。E-mail: qijing@heuet.edu.cn

和润肺护肝等药用价值。近年来，随着生活水平的不断提高，对梨果品终年供应的需求问题日渐突出，果品的延熟保鲜及延长果实的货架寿命，已经成为鸭梨果品生产经营中的一个重大难题。我国科技工作者围绕着延长鸭梨贮藏期的问题进行了大量的研究工作，先后探明了鸭梨果实在采收、贮藏和加工等过程中外界环境对果实衰老的影响（朱麟等，2009；李家政等，2012），并基于此明确了一系列果品保鲜措施，但这些举措并不能从根本上实现对鸭梨果实衰老生理的调控，因而也就无法完全解决鸭梨果实保鲜问题。只有对影响鸭梨果实贮藏特性相关的基因进行改造，培育耐贮藏鸭梨新品种才是解决鸭梨果品保鲜问题的关键。

已有研究证实，鸭梨是典型的呼吸越变型果实，乙烯对其果实成熟具有重要调控作用（张宪省和阎先喜，1994）。降低梨果实的内源乙烯合成，是延长其果实贮藏、保鲜期的根本途径之一。乙烯在植物体内的生物合成途径为：Met（甲硫氨酸）→SAM（S-腺苷甲硫氨酸）→ACC（1-氨基环丙烷-1-羧酸）→Ethylene（乙烯）（Yang 和 Hoffman，1984），这一过程的最终步骤乙烯直接前体ACC的氧化受到ACC氧化酶（ACO）调控，改变ACC氧化酶在植物体内的含量将会直接影响到乙烯的体内合成（Adams 和 Yang，1979）。基于ACC氧化酶在乙烯内源合成中的重要调控作用，本研究借助反义RNA技术抑制鸭梨ACC氧化酶内源合成为目标，围绕着鸭梨ACC氧化酶基因开展了cDNA片段的克隆和反义表达载体构建的研究；并借助农杆菌介导的遗传转化技术成功实现了ACC氧化酶基因片段对鸭梨组培苗的反义遗传转化，从而为将来培育出耐储梨新品种及其他果树耐储新品种的培育提供了优质种质资源，也为反义RNA技术在鸭梨遗传改良研究中的进一步应用提供了参考资料。

1　材料与方法

1.1　材料

鸭梨果实采自河北农业大学标本园。采摘成熟、无病害果实，用冰盒带回实验室，4 ℃低温保存。

大肠杆菌菌株DH5α、克隆载体pUCm-T Vector、UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒和DNA胶回收试剂盒为上海生工公司产品；Oligo（dT）15、RTase M-MLV、Taq酶、dNTP、限制性内切酶、T4连接酶、基因组提取试剂盒以及DNA Marker均购自TAKARA公司；地高辛标记和检测试剂盒为美国罗氏公司产品；其他常规化学试剂均为国产分析纯。真核表达载体pBI121和农杆菌LBA4404为本实验室保存。

1.2　引物设计

根据GenBank上公布的ACC氧化酶基因保守序列，利用Oligo6.0软件设计一对PCR扩增引物：上游引物为5′ TTGTGAGAACTGGGGTTTCTTTGAG 3′，下游引物为5′ TCATAGCTTCAAACCTTGGTTCTTT 3′，引物由上海生工公司合成。

1.3　RNA提取及RT-PCR

鸭梨果实总RNA提取和纯化参考改良CTAB法（董祯，2007）进行。纯化后的RNA在RTase M-MLV的作用下，以Oligo（dT）15为引物进行反转录合成。以获得的反转录产物为模板，进行PCR扩增，反应总体系为25 μL，其中包含模板50 ng、10×PCR Buffer 2.5 μL、Taq酶1.5 U以及上下游引物各30 ng，Mg^{2+}浓度为2.0 mmol·L^{-1}，dNTP浓度为0.25 mmol·L^{-1}。PCR反应在德国Biometra公司生产的T Gradient PCR仪中进行，扩增程序为：94 ℃预变性7 min，94 ℃变性50 s，52 ℃退火1 min，72 ℃延伸1 min，共35个循环；72 ℃完全延伸5 min。

1.4　目的片段的克隆与测序

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后，用DNA胶回收试剂盒收集目的片段，并与pUCm-T Vector连接，热击法转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中进行篮白斑筛选。挑取阳性重组菌落扩繁后用小量抽提试剂盒提取质粒，酶切鉴定后，将菌液送上海生工公司进行测序。

1.5　鸭梨ACC氧化酶基因反向插入表达载体及转化农杆菌

对经测序鉴定后ACC氧化酶基因片段反向插入在pUCm-T Vector多克隆位点的重组质粒以及真核表达载体pBI121进行XbaI/SacI双酶切，电泳分离后分别回收目标基因片段和切除Gus基因的pBI121线性载体，用T4连接酶连接过夜后，冻融法转化农杆菌LBA4404，在Kan/Rif抗生素平板上筛选重组菌落，扩繁后小量抽提试剂盒回收质粒，分别用XbaI/SacI酶切和PCR鉴定。PCR引物及反应条件同前所述。

1.6　鸭梨的遗传转化

参照李桂琴等（2010a，b）构建的鸭梨的再生体系和遗传转化体系进行鸭梨的遗传转化。将预培养2 d的鸭梨叶片愈伤组织作为遗传转化的起始材料，置于OD_{600}为0.8的农杆菌菌液中浸渍10 min，用滤纸吸去多余的菌液，接种于再生培养基（NN69+BA3.0 mg·L^{-1}+IAA0.5 mg·L^{-1}）避光共培养2 d，再加入200 μg·mL^{-1}的

头孢噻肟钠（Cef）抑菌。然后将抗性芽转入芽再生选择培养基（NN69+BA3.0 mg·L^{-1}+IAA0.5 mg·L^{-1}+Cef200 mg·L^{-1}+Kan 5 mg·L^{-1}）培养，待不定芽长度为4~6 cm时，切取带有顶芽或腋芽的片段1.5~2 cm，接种于抗性苗筛选培养基（MS+BA1.0 mg·L^{-1}+NAA0.5 mg·L^{-1}+Cef 200 mg·L^{-1}+Kan 20 mg·L^{-1}）上培养，筛选卡那霉素抗性鸭梨再生苗。

1.7 转基因鸭梨的 PCR 鉴定

根据GenBank公布的NPT II基因序列设计一对特异性引物，上游引物（5′ CGTCTGTCGAGAAGTTTC 3′）和下游引物（5′ TACTTCTACACAGCCATC 3′），按大连宝生物工程有限公司基因组提取试剂盒提供的方法提取卡那霉素抗性转基因鸭梨DNA，进行PCR扩增。取10 μL PCR产物，加入6×Loading Buffer 2 μL，充分混匀后在1%琼脂糖凝胶、5 V/cm电压下，电泳20 min后显影、照相。

1.8 转基因鸭梨的 Southern 杂交分析

根据35S启动子序列设计一对引物，上游引物（5′ AGGCTTACGCAGCAGGTCTCAT 3′）和下游引物（5′ GGAAGGGTCTTGCGAAGGAATG 5′），以pBI121质粒为模板，PCR扩增制备Southern杂交探针，与*EcoR* I消化的转基因鸭梨基因组进行Southern杂交，探针制备和Southern杂交参照美国罗氏公司地高辛标记和检测试剂盒说明书，以检测转入的反义ACC氧化酶基因片段在基因组中的拷贝数。

2 结果与分析

2.1 鸭梨 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆和分析

根据ACC氧化酶基因的保守序列设计一对特异性引物，以成熟鸭梨果实总RNA为模板进行RT-PCR扩增，得到一条长度约为850 bp的cDNA片段，如图1所示。将该片段回收、纯化后与pUCm-T Vector连接，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，经篮白斑筛选后，挑取阳性菌落扩繁，并用小量抽提试剂盒回收重组质粒，经*EcoR* I和*Xba* I双酶切后电泳，结果如图2所示。重组质粒均可酶切出两条片段，除2 800 bp左右的pUCm-T Vector自身片段外，还有一条850 bp左右的插入片段，与扩增片段长度相符，证实扩增片段已成功的插入重组质粒中。

将经酶切鉴定的阳性菌落送交上海生工公司进行测序，测序结果表明，所克隆的cDNA片段长度为831 bp，其最大读码框位于2~829 bp之间，共828个碱基，编码276个氨基酸残基（图3）。在GenBank上共检索到9个梨ACC氧化酶基因cDNA序列，GenBank编号分别为EF451060（幸水梨）、D67038（长十郎梨）、EU047708（雪花梨）、AB265797（鸭梨）、X87097（帕斯-卡桑梨）、EU047709（黄金梨）、EU047710（茄梨）、AJ504857（葡脆梨）和AB042111（长十郎梨）。借助DNASTAR软件，将这些序列与已克隆片段（PY-ACO1）进行核酸序列同源性比较可知（图4），所克隆的基因片段与其它9个品种梨ACC氧化酶基因cDNA序列的同源性均在94%以上，其中与幸水梨、长十郎梨和雪花梨的ACC氧化酶基因的cds序列同源性近似100%。这说明本研究所得到的片段与前人获得的其它梨

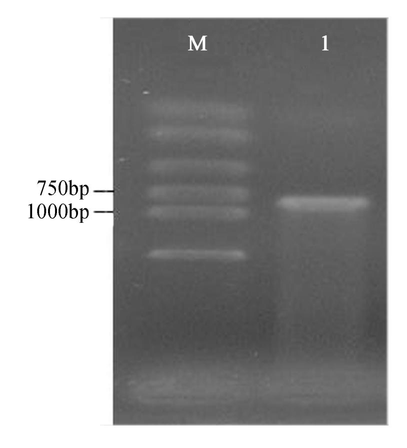


图1 RT-PCR电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of RT-PCR

M：DL2000 Marker；Lane 1：PCR produce

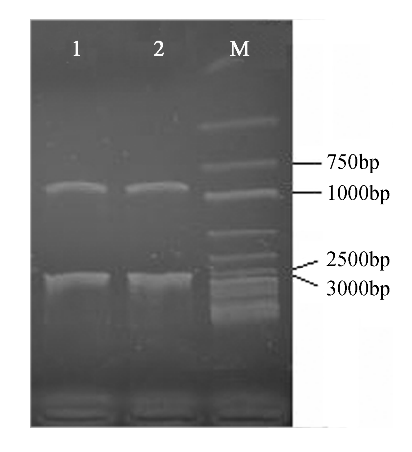


图2 重组质粒经*EcoR* I和*Xba* I双酶切后电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid doubledigest by *EcoR* I and *Xba* I

Lane 1&2：Recombinant plasmid doubledigest by *EcoR* I and *Xba* I；M：1 kb DNA Ladder

品种 ACC 氧化酶基因 cDNA 序列一致性很高，因而可以判定此片段为鸭梨的 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段。将此片段命名为 PY-ACO1，并登陆 GenBank，登陆号为 EU333282。

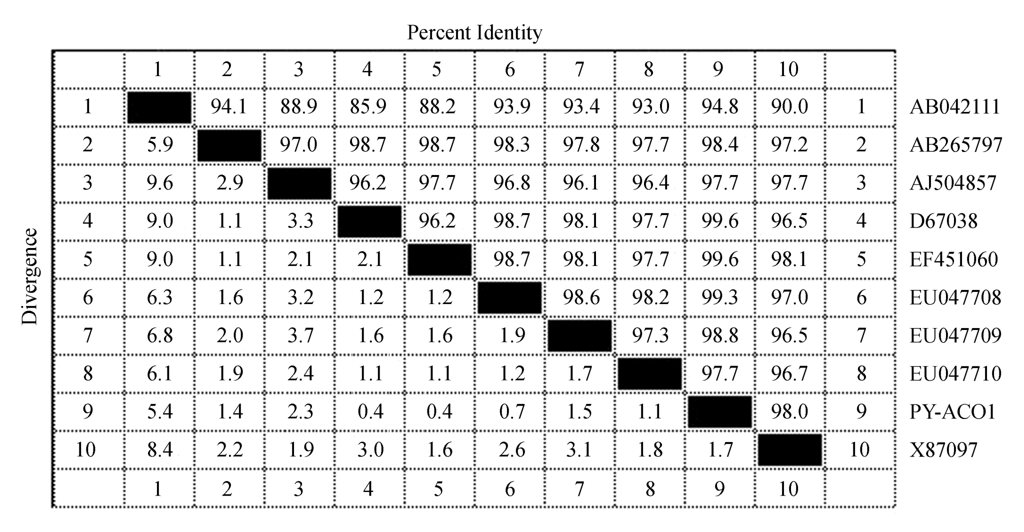
2.2　鸭梨 ACC 氧化酶基因反义表达载体的构建

PY-ACO1 在克隆到载体 pUCm-T Vector 时存

```
1     TTGTGAGAACTGGGGTTTCTTTGAGTTGGTGAACCATGGGATATCTACTGAGCTTTTGGA
1      C  E  N  W  G  F  F  E  L  V  N  H  G  I  S  T  E  L  L  D
61    CACTGTGGAGAAGATGACCAAGGATCACTACAAGAAGACCATGGAGCAAAGGTTTAAGGA
21     T  V  E  K  M  T  K  D  H  Y  K  K  T  M  E  Q  R  F  K  E
121   AATGGTGGCAGCCAAAGGCCTCGACGCTGTCCAGTCCGAAATCCACGACTTGGACTGGGA
41     M  V  A  A  K  G  L  D  A  V  Q  S  E  I  H  D  L  D  W  E
181   AAGCACCTTCTTCTTGCGCCACCTTCCTTCCTCAAACATTTCCGAAGTCCCTGATCTCGA
61     S  T  F  F  L  R  H  L  P  S  S  N  I  S  E  V  P  D  L  E
241   GGAAGATTACAGGAAGACCATGAAAGAATTTGCAGTGGAACTGGAGAAGCTAGCTGAGAA
81     E  D  Y  R  K  T  M  K  E  F  A  V  E  L  E  K  L  A  E  K
301   GCTTTTGGACTTGCTGTGTGAGAATCTTGGACTCGAGAAGGGTTATCTGAAGAAGGTTTT
101    L  L  D  L  L  C  E  N  L  G  L  E  K  G  Y  L  K  K  V  F
361   CTATGGATCCAAGGGTCCGAATTTTGGGACCAAGGTCAGCAACTACCCTCCATGCCCCAA
121    Y  G  S  K  G  P  N  F  G  T  K  V  S  N  Y  P  P  C  P  K
421   GCCAGACCTGATCAAGGGACTCCGGGCCCACAGCGACGCCGGTGGCATCATCCTGCTTTT
141    P  D  L  I  K  G  L  R  A  H  S  D  A  G  G  I  I  L  L  F
481   CCAGGATGACAAGGTCAGCGGCCTCCAGCTTCTCAAGGATGGTGAATGGGTGGATGTCCC
161    Q  D  D  K  V  S  G  L  Q  L  L  K  D  G  E  W  V  D  V  P
541   CCCAATGCACCACTCCATTGTCATAAACTTAGGTGACCAGATTGAGGTGATCACCAATGG
181    P  M  H  H  S  I  V  I  N  L  G  D  Q  I  E  V  I  T  N  G
601   GAAGTACAAGAGTGTGATGCACCGGGTGATAGCTCAGTCGGACGGGACCAGAATGTCGAT
201    K  Y  K  S  V  M  H  R  V  I  A  Q  S  D  G  T  R  M  S  I
661   AGCCTCGTTCTACAACCCAGGCGATGATGCCTTTATCAGCCCAGCACCGGCAGTGCTTGA
221    A  S  F  Y  N  P  G  D  D  A  F  I  S  P  A  P  A  V  L  E
721   GAAGAAAACTGAGGACGCCCCAACTTATCCCAAGTTTGTGTTTGATGACTACATGAAGCT
241    K  K  T  E  D  A  P  T  Y  P  K  F  V  F  D  D  Y  M  K  L
781   GTATTCTGGCCTGAAATTCCAAGCCAAAGAACCAAAGTTTGAAGCTATGAA
261    Y  S  G  L  K  F  Q  A  K  E  P  K  F  E  A  M
```

图 3　鸭梨 ACC 氧化酶基因片段的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 3　The nucleotide and deduce amino acids of cDNA fragment encoding ACC oxidase from Yali fruit



Percent Identity (upper triangle) / Divergence (lower triangle)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		94.1	88.9	85.9	88.2	93.9	93.4	93.0	94.8	90.0	1	AB042111
2	5.9		97.0	98.7	98.7	98.3	97.8	97.7	98.4	97.2	2	AB265797
3	9.6	2.9		96.2	97.7	96.8	96.1	96.4	97.7	97.7	3	AJ504857
4	9.0	1.1	3.3		96.2	98.7	98.1	97.7	99.6	96.5	4	D67038
5	9.0	1.1	2.1	2.1		98.7	98.1	97.7	99.6	98.1	5	EF451060
6	6.3	1.6	3.2	1.2	1.2		98.6	98.2	99.3	97.0	6	EU047708
7	6.8	2.0	3.7	1.6	1.6	1.9		97.3	98.8	96.5	7	EU047709
8	6.1	1.9	2.4	1.1	1.1	1.2	1.7		97.7	96.7	8	EU047710
9	5.4	1.4	2.3	0.4	0.4	0.7	1.5	1.1		98.0	9	PY-ACO1
10	8.4	2.2	1.9	3.0	1.6	2.6	3.1	1.8	1.7		10	X87097
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

图 4　不同梨品种 ACC 氧化酶基因同源性分析

Fig. 4　Sequence distances assay of ACO genes from different cultivar of pears

在正、反两种插入方式，选择经测序验证 PY-ACO1 反向插入 pUCm-T Vector 的重组质粒，进行 *Xba* I/*Sac* I 双酶切，电泳回收小片段，与用同样酶切的 pBI121 线性载体进行定向连接，构建鸭梨 ACC 氧化酶的反义表达载体。构建好的反义表达载体图谱如图 5 所示。

将获得的反义表达载体转化农杆菌 LBA4404，在 Kan/Rif 抗生素平板挑取单菌落进行扩繁，回收质粒后进行 *Xba* I/*Sac* I 双酶切鉴定，结果显示酶切出 850 bp 左右片段（图 6），与 PY-ACO1 片段长度相符；进一步以 PY-ACO1 引物对提取的质粒进行 PCR 鉴定，扩增结果同图 1，再次证实鸭梨 ACC 氧化酶反义表达载体构建成功并已导入农杆菌 LBA4404，该农杆菌工程菌可用于遗传转化的研究。

2.3　农杆菌介导的反义表达载体对鸭梨的遗传转化

参照李桂琴等（2010a, b）构建的鸭梨的再生体系和遗传转化体系进行鸭梨的遗传转化。以预培养 2 d 的鸭梨叶片愈伤组织为起始材料，置于 OD_{600} 为 0.8 的农杆菌工程菌液中浸渍 10 min，其后接种于再生培养基中避光共培养 2 d，再加入 200 μg·mL^{-1} 的头孢噻肟钠（Cef）抑菌。一周后，共长出抗性芽 412 个。将抗性芽转入再生选择培养基培养，待不定芽长度长至 4～6 cm 时，切取带有顶芽或腋芽的片段 1.5～2 cm，接种于抗性苗筛选培养基上培养，中间更换培养基一次，最终共得到 Kan 抗性鸭梨苗 29 株，占抗性芽总数的 7.03%。

2.4　转基因鸭梨的 PCR 鉴定

提取 Kan 抗性鸭梨转基因植株总 DNA，根据 GenBank 上公布的 NPT II 基因序列设计一对特异性引物，对鸭梨转基因植株进行 PCR 鉴定，结果如图 7 所示。可以看出，以未转基因鸭梨植株 DNA 为模板的阴性对照（泳道 2）没有扩增产物，而以反义表达载体质粒为模板的阳性对照（泳道 1）和 4 株转基因植株均能扩增出 800 bp 的目标片段，与设计长度相符，初步证实这 4 株鸭梨植株中反义 ACC 氧化酶基因已经成功转化。而另外 25 株鸭梨未能扩增出目标片段，表现为假阳性，占 Kan 抗性植株总数的 86.21%。

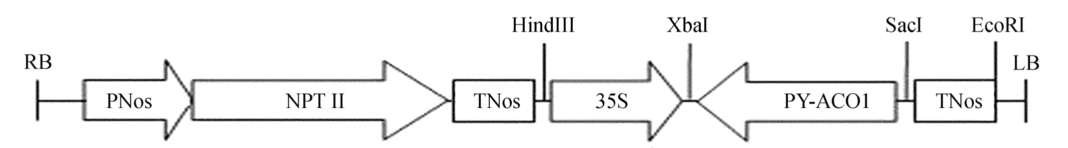


图 5　鸭梨 ACC 氧化酶反义表达载体图谱

Fig. 5　Diagram of antisense express vector of PY-ACO1

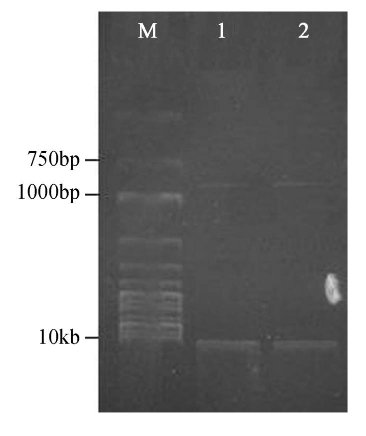


图 6　鸭梨 ACC 氧化酶反义表达载体经 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切后电泳图谱

Fig. 6　Electrophoresis pattern of antisense express vector of PY-ACO1 doubledigest by *EcoR* I and *Xba* I

M：1 kb DNA Ladder；Lane 1&2：antisense express vector of PY-ACO1

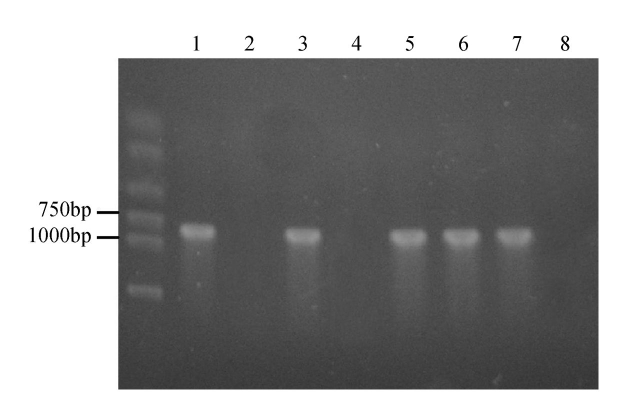


图 7　鸭梨转基因植株 PCR 鉴定结果

（泳道 1 为阳性对照；泳道 2 为阴性对照；泳道 3~8 为鸭梨转基因植株）

Fig. 7　PCR analysis of transgenic Yali plant

（Line 1 is positive control；line 2 is negative control；line 3-8 is transgenic Yali plants）

2.5　转基因鸭梨的 Southern 杂交分析

将经 PCR 鉴定呈阳性的转基因鸭梨植株总 DNA 用 *EcoR* I 酶切后，电泳转膜，以 35S 启动子片段为探针进行 Southern 杂交，对转基因植株进行进一步鉴定。Southern 杂交结果（图 8）表明，4 株经 PCR 鉴定呈阳性的鸭梨转基因植株（泳道 3~5）均检测到了杂交信号，外源基因转入植株的拷贝数除 1 株（第 6 泳道）为双拷贝外，其中 3 株均为单拷贝；而未转化对照植株中没有出现任何杂交信号。从而再次证实鸭梨 ACC 氧化酶反义基因已经成功转化到了这 4 棵植株中。

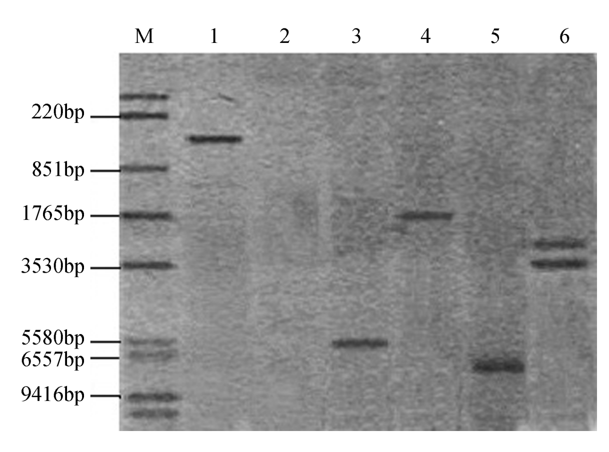


图 8　转基因鸭梨植株的 Southern 杂交分析结果
（M 为地高辛标记的 DNA marker；1 为阳性对照；2 为未转基因鸭梨植株；3~6 为转基因鸭梨植株）
Fig. 8　Southern blot analysis of transgenic Yali plants
（M：Dig labeled DNA marker；line 1 is positive control；line 2 is negative control；line 3~6 is transgenic Yali plants）

3　讨论

鸭梨为多年生木本果树，因其具有童期长、基因高度杂合的特性，使得借助传统育种方法育种困难重重，而反义 RNA 技术凭借其专一性高、育种周期短的优势给梨育种带来了一条新的途径。借助反义 RNA 技术，将 ACC 氧化酶基因片段反向连接在一启动子上并转化梨植株，必将会极大的加快耐储梨新品种的培育步伐。对于反义 RNA 技术而言，构建到反义表达载体中的基因片段正确与否关乎整个实验的成败。本研究根据 ACC 氧化酶基因保守序列设计引物，借助 RT-PCR 方法所克隆的 cDNA 片段经序列分析显示出与其它梨品种来源 ACC 氧化酶基因序列的高度同源性，这充分证实该片段为鸭梨 ACC 氧化酶基因组成部分，以此片段制备的反义表达载体可特异性抑制鸭梨内源 ACC 氧化酶基因的表达。同时，也正是基于该片段与其他梨品种 ACC 氧化酶基因序列的高度同源，本研究所构建的反义表达载体也可以应用到其它梨品种的转基因研究中，而不受到品种区别的限制，这会给今后开展其它梨品种应用反义 RNA 技术延长果实贮藏期带来很大的方便。

李桂琴等（2010a，b）构建了鸭梨的再生体系和遗传转化体系，本研究对鸭梨的遗传转化是在其再生体系的基础上进行的，但考虑到所应用的农杆菌类型不同、抑菌素类型不同（其农杆菌为 EHA105，抑菌素为羧苄青霉素），我们对影响鸭梨遗传转化的因素进行了再次分析（未发表）。结果发现，除农杆菌工程菌液浓度、侵染时间不同外，其它遗传转化条件均一致。可见，与植物基因型相比，农杆菌类型对遗传转化体系的影响较小，仅局限于侵染条件有所区别。但是对于同一物种应用不同的农杆菌进行遗传转化时，还是应根据农杆菌的类型对已有的遗传转化体系进行适当调整，方能有效的实现外源基因的转化。

一般说来，对于转基因植物的鉴定，最直接、简单的方式莫过于分子水平的检测。PCR 扩增、Southern 杂交和 Northern 杂交是常用的分子水平检测方法。在本研究中由于向鸭梨植株中转化的是反义 ACC 氧化酶基因片段，受基因组自身含有 ACC 氧化酶基因的影响，我们如果直接针对转入的反义片段进行鉴定，将有可能做出错误的推断。因此，PCR 扩增、Southern 分析都是围绕着与反义片段同时转入的 NPTⅡ基因和 35S 启动子进行的。尽管从分子水平上讲这种验证是间接的，但在反义表达载体构建时，NPTⅡ基因、35S 启动子和目的基因是连接在一起的，因而我们有理由相信目的基因也一并插入到了受体基因组中，这在其它反义遗传转化中也已得到证实（叶志彪，2000）。

在转基因的研究中，抗生素筛选呈阳性，而经分子水平检测呈假阳性的现象常有发生（Urban 等，1994；Mitiouchkina 和 Dolgov，2000）。在本研究中，共得到 29 个卡那霉素抗性苗，但经

PCR 检测确定为转化株的抗性苗仅有 4 株，PCR 阳性率为 13.79%。导致假阳性率偏高的原因，可能由于我们仅对抗性苗进行了两代筛选，且卡那霉素浓度较低，筛选压不够造成的；或者有可能在假阳性苗上存在有残留农杆菌，降低了其周围培养基中的卡那霉素浓度，从而让其逃避了选择压力而继续生长。过多假阳性苗给我们的鉴定工作带来了诸多不便，因此我们建议在鸭梨的遗传转化研究中可适当加大卡那霉素的筛选浓度并增加筛选代数，同时也要注意残留农杆菌的清除工作，以最大程度的抑制假阳性的发生，节省科研工作量。

大量研究证实 ACC 氧化酶在植物体内存在同工酶，其编码基因构成多基因家族（Kim 和 Yang，1994；Kahana 等，1999），基因家族成员间具有不同的功能和时空表达模式，分别负责系统 1 型和系统 2 型乙烯的内源合成（McMurchie 等，1972；Yang 和 Hoffman，1984）。梨上是否存在 ACC 氧化酶基因家族目前虽然并不清楚，但在本研究中所用反义转化的鸭梨 ACC 氧化酶基因片段克隆自鸭梨果实，并仅在鸭梨花和果实中表达（结果将于近期发表），所以我们推测该 ACC 氧化酶基因主要负责鸭梨生殖器官中系统 2 型乙烯的合成，而营养器官中低速率基础乙烯的生成，即系统 1 型乙烯的生物合成由其它 ACC 氧化酶基因家族成员调控。也正是由于该鸭梨 ACC 氧化酶基因在营养器官中不表达，受材料的限制，我们未对转基因鸭梨中反义 RNA 的抑制效果做 Northern 杂交等基因表达水平检测，相关的鉴定只能等待转基因鸭梨日后开花、结果后方能进行。

〔参 考 文 献〕

Adams DO, Yang SF, 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid asan intermediate in the conversion of methionine to ethylene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**: 170—174

Dong Z（董祯）, 2007. The study on the ACC oxidase genes clone of pear fruit [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei Province

Kahana A, Silberstein L, Kessler N *et al.*, 1999. Expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber [J]. *Plnat Molecular Biology*, **41** (4): 517—528

Kim WT, Yang SF, 1994. Structure and expression of cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from excised mung bean hypocotyls [J]. *Planta*, **194** (1): 223—229

Li GQ（李桂琴）, Qi J（齐靖）, Gao ZH（高志华）*et al.*, 2010a. Construction and transformation for antisense expression vector of polyphenol oxidase gene in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*（植物遗传资源学报）, **05**: 635—639

Li GQ（李桂琴）, Zhang YX（张玉星）, Gao ZH（高志华）*et al.*, 2010b. Establishment of shoot regeneration system from leaf Yali pear [J]. *Journal of Fruit Science*（果树学报）, **03**: 436—440

Li JZ（李家政）, Yang WD（杨卫东）, Ma J（马骏）*et al.*, 2012. Effects of high carbon dioxide permeability film packaging on postharvest physiology and storage properties of Yali pear fruit [J]. *Storage & Process*（保鲜与加工）, **12** (1): 16—19

McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL, 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene [J]. *Nature*, **237**: 235—236

Mitiouchkina TY, Dolgov SV, 2000. Modifieation of chrysanthemum plant and flower architecture by *rolC* gene from Agrobacterium rhizogenes introduction [J]. *Acta Horticulturae*, **508**: 163—169

Urban LA, Sherman JM, Moyer JW *et al.*, 1994. High frequency shoot regeneration and Agrobacterium- mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) [J]. *Plant Science*, **98** (1): 69—79

Yang SF, Hoffman NE, 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in high plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**: 155—189

Ye ZB（叶志彪）, 2000. Genetic transformation with antisense cDNA of ethylene-forming enzyme and the breeding of longer shelf-life cultivar in tomato [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University

Zhang XS（张宪省）, Yan XX（阎先喜）, 1994. Progress in fruit ripening by controlling ethylene [J]. *Journal of Shandong Agricultural University*（山东农业大学学报）, **25** (4): 487—490

Zhu L（朱麟）, Li JK（李江阔）, Zhang J（张静）*et al.*, 2009. Effects of 1-MCP treatment on Ya pear storage of different harvest [J]. *Northern Horticulture*（北方园艺）, **5**: 222—224